

JP9-505464 Abstract

SELF-SUSTAINED SEQUENCE REPLICATION ELECTROCHEMILUMINESCENT NUCLEIC ACID ASSAY

Patent number: JP9505464T
 Publication date: 1997-06-03
 Inventor: KENTEN JOHN (US); SMITH RODGER (US)
 Applicant: IGEN INC (US); KENTEN JOHN (US); SMITH RODGER (US)
 Classification:
 - International: C12Q1/68; G01N21/78; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58; C12N15/09
 - European: C07H21/00G; C07H23/00D; C12Q1/68A2; C12Q1/68B2; C12Q1/68D4; C12Q1/68D8; C12Q1/70B2B
 Application number: JP19940509934T 19940921
 Priority number(s): WO1994US10732 19940921; US19930124686 19930922

Also published as:

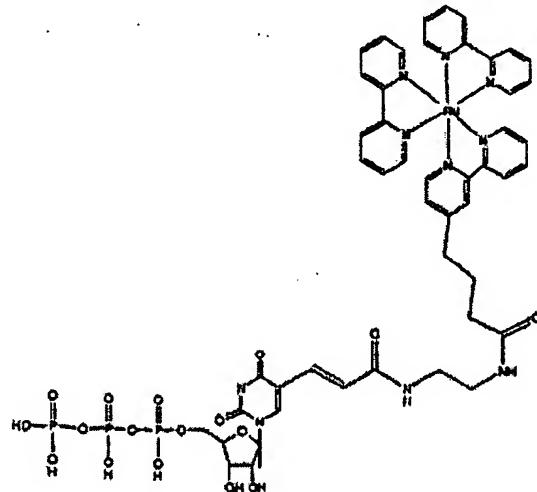

 WO9508644 (A1)
 EP0722508 (A1)
 JP2002034561 (A)
 EP0722508 (A4)
 EP0722508 (B1)

[more >>](#)[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP9505464T

Abstract of corresponding document: WO9508644

This invention relates to an improved process for detecting and quantifying a desired nucleic acid sequence. This process involves synthesizing single stranded RNA, single stranded DNA, double stranded DNA followed by detection using an electrochemiluminescent labeled binding species. The figure illustrates an electrochemiluminescent labeled nucleotide for polymerase incorporation in nucleic acid.



ECL labeled nucleotide for polymerase incorporation

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-505464

(43) 公表日 平成9年(1997)6月3日

(51) Int.Cl.®	識別記号	序内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 21/78		0276-2 J	G 0 1 N 21/78	C
33/53		0276-2 J	33/53	M
33/566		0276-2 J	33/566	
33/58		0276-2 J	33/58	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-509934	(71)出願人	イゲン, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックビル, イースト ジェファーソン ストリート 1530
(86) (22)出願日	平成6年(1994)9月21日	(72)発明者	ケンテン, ジョン アメリカ合衆国 20841 メリーランド州 ボイズ, シュガー リッジ テラス 21021
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)3月22日	(72)発明者	スミス, ロジャー アメリカ合衆国 21755 メリーランド州 ジェファーソン, ミルフォード コート 4660
(86)国際出願番号	PCT/US94/10732	(74)代理人	弁理士 浅村 眩 (外3名)
(87)国際公開番号	WO95/08644		
(87)国際公開日	平成7年(1995)3月30日		
(31)優先権主張番号	08/124, 686		
(32)優先日	1993年9月22日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 自立性配列複製電気化学発光核酸測定法

(57) 【要約】

本発明は目的の核酸配列を検出し定量するための改良方法に関する。本方法は一本鎖RNA、一本鎖DNA、二本鎖DNAを合成し、次いで電気化学ルミネッセンス標識結合種を用いて検出することを含む。図は核酸中へのポリメラーゼ取込みのための電気化学発光標識ヌクレオチドを表している。

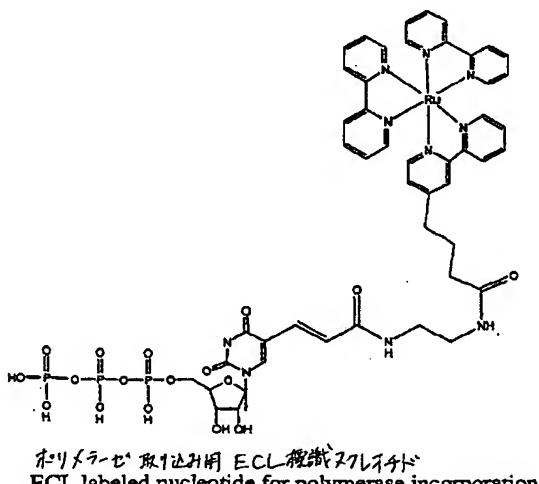


Figure 7

【特許請求の範囲】

1. 特定の核酸配列の検出方法であって、以下の工程からなる方法：
 - (a) (i) 第一のオリゴヌクレオチドプライマー、
(ii) プロモーターのアンチセンス配列からなる第二のオリゴヌクレオチドプライマー、
(iii) 該プロモーターを認識するDNA依存性RNAポリメラーゼ、
(iv) RNA依存性DNAポリメラーゼ、
(v) DNA依存性DNAポリメラーゼ、
(vi) 一本鎖又は二本鎖のRNA又はDNAを加水分解することなくRNA-DNAハイブリッドのRNAを加水分解するリボヌクレアーゼ、及び
(vii) リボヌクレオシド及びデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートからなる試薬を含む单一の反応媒体を提供する工程、
 - (b) 上記反応媒体中に、上記特定の核酸配列又は該特定の核酸配列に相補的な配列からなるRNA第一錆型からなるRNAを、
 - (i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記RNA第一錆型にハイブリダイズし、
 - (ii) 上記RNA依存性DNAポリメラーゼが上記RNA第一錆型を用いて上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によってDNA第二錆型を合成し、これによりRNA-DNAハイブリッド中間体を形成し、
 - (iii) 上記リボヌクレアーゼが該RNA-DNAハイブリッド中間体からなるRNAを加水分解し、
 - (iv) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記DNA第二錆型にハイブリダイズし、
 - (v) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが錆型として上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて上記プロモーターを上記DNA第二錆型の伸長によって合成し、そして
 - (vi) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二錆型を転写し、これにより上記RNA第一錆型のコピーを提供す

る

というサイクルが起こるような条件下で提供する工程、その後

(c) 上記条件を上記特定の核酸配列の目的の増幅を達成するのに十分な時間維持し、次いで

(i) 電気化学発光種で標識された上記R N A第一鋳型に相補的な少なくとも一つのプローブ配列、

(ii) 結合種で標識された上記R N A第一鋳型に相補的な少なくとも一つの第二捕獲プローブ配列、

(iii) 上記第二プローブ配列に相補的な結合種で被覆されたビーズを添加する工程、その後で、

(d) 上記R N A第一鋳型にプローブがハイブリダイズし、上記第二捕獲プローブ上の上記結合種が上記ビーズ上の相補的な結合種と結合して、ビーズ結合複合体を形成するような、温度及び緩衝液の条件を提供する工程、次いで

(e) 上記電気化学発光種を用いて上記ビーズ結合複合体を検出する工程。

2. 上記R N A第一鋳型が該特定の核酸配列からなり、工程(B)が、

(i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖R N Aにハイブリダイズし、

(ii) 上記R N A依存性D N Aポリメラーゼが鋳型として一本鎖R N Aを使用して上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によってD N A第二鋳型を合成し、これによりR N A-D N Aハイブリッドを形成し、

(iii) 上記リボヌクレアーゼが上記R N A-D N AハイブリッドからなるR N Aを加水分解し、

(iv) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記D N A第二鋳型にハイブリダイズし、

(v) 上記D N A依存性D N Aポリメラーゼが鋳型として上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して上記D N A第二鋳型の伸長によって上記プロモーターを合成し、

(vi) 上記D N A依存性R N Aポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記D N A第二鋳型を転写し、これにより上記R N A第一鋳型のコピーを提供するよ

うに、

上記反応媒体中に一本鎖RNAを提供することからなる、請求項1記載の方法。

3. 上記RNA第一錆型が該特定の核酸配列に相補的な配列からなり、工程(B)が、

(i) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖RNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記RNA依存性DNAポリメラーゼが錆型として該RNAを使用して上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって相補的なDNAを合成し、これによりRNA-DNAハイブリッドを形成し、

(iii) 上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解し、

(iv) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記相補的DNAにハイブリダイズし、

(v) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが錆型として該相補的DNAを使用して上記第一オリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって上記DNA第二錆型と上記プロモーターとを合成し、

(vi) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二錆型を転写し、これにより上記RNA第一錆型のコピーを提供するように、

上記反応媒体中に一本鎖RNAを提供することからなる、請求項1記載の方法。

4. 工程(B)が、

(i) 上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖DNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが錆型として上記一本鎖RNAを使用して上記第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長によって上記DNA第二錆型と上記プロモーターとを合成し、

(iii) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二錆型を転写し、これにより上記RNA第一錆型のコピーを提供するように、

上記プロモーターのアンチセンス配列からなる一本鎖DNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項1記載の方法。

5. 工程(B)が、上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解するように、上記一本鎖DNAからなるRNA-DNAハイブリッドを、上記反応媒体に添加することからなる請求項4記載の方法。

6. 工程(B)が、

(i) 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーが上記一本鎖DNAにハイブリダイズし、

(ii) 上記DNA依存性DNAポリメラーゼが錆型として該第二のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して上記DNA第二錆型の伸長によって上記プロモーターを合成し、

(iii) 上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記プロモーターを認識し、上記DNA第二錆型を転写し、これにより上記RNA第一錆型のコピーを提供するよう、

上記DNA第二錆型からなる一本鎖DNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項1記載の方法。

7. 工程(B)が、上記リボヌクレアーゼが上記RNA-DNAハイブリッドからなるRNAを加水分解するように、上記一本鎖DNAからなるRNA-DNAハイブリッドを、上記反応媒体に添加することからなる請求項6記載の方法。

8. 工程(B)が、上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記DNAを転写し、これにより上記一本鎖RNAを合成するように、上記プロモーターからなるDNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項2記載の方法。

9. 工程(B)が、上記DNA依存性RNAポリメラーゼが上記DNAを転写し、これにより上記一本鎖RNAを合成するように、上記プロモーターからなるDNAを、上記反応媒体に添加することからなる請求項3記載の方法。

10. 上記第二のオリゴヌクレオチドプライマーがさらに上記DNA依存性RNAポリメラーゼのための転写開始部位のアンチセンス配列からなり、該転写

開始部位のアンチセンス配列が上記プロモーターのアンチセンス配列に操作的に

結合している請求項1記載の方法。

1 1. 上記RNA依存性DNAポリメラーゼがレトロウイルス逆転写酵素である請求項1記載の方法。

1 2. 上記DNA依存性DNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ活性を欠いている請求項1記載の方法。

1 3. 上記反応媒体中のすべてのDNAポリメラーゼがエキソヌクレアーゼ及びDNAエンドヌクレアーゼ活性を欠いている請求項1記載の方法。

1 4. 上記DNA依存性DNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼ α 又はDNAポリメラーゼ β である請求項1記載の方法。

1 5. 以下の工程からなる增幅産物の検出方法：

(a) 試料核酸を增幅産物を発生する条件下で増幅する工程、

(b) 上記増幅産物を、

(i) 増幅された核酸及び二価結合種との三分子複合体と相互作用するECL標識結合種、

(ii) 増幅された核酸及びECL標識結合種との三分子複合体と相互作用する二価結合種

からなる二つの結合種とともに混合して結合複合体反応物を形成する工程、

(c) 上記結合複合体反応物を增幅産物、ECL標識結合種及び二価結合種の三分子複合体を形成するような条件下でインキュベートする工程、

(d) 上記三分子複合体を二価結合種の残りの結合部位を介して固相に捕獲する工程、及び

(e) 固相上に捕獲されたECL標識を定量する工程。

1 6. 上記増幅条件が等温的である請求項15記載の方法。

1 7. 上記結合種が、抗体：抗原、オリゴヌクレオチド：オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド：抗体、オリゴヌクレオチド：抗原、DNA：DNA、DNA：RNA、RNA：RNA、DNA：RNA：DNA、ビオチン-DNA：DNA-ECL標識、レセプター：リガンド、及びDNA結合タンパクからなる群より選ばれる請求項15記載の方法。

18. 以下の工程からなる試料の定量的測定方法：

(a) 未知の試料を既知の試料を用いて同じプライマーにより増幅して、未知の試料と既知の試料とのコピーを含む増幅産物の混合物を形成する工程、ただし上記既知の試料は未知の試料の配列に対して非相同性の配列を含むものである、

(b) 該増幅産物の混合物を取り、未知の試料と既知の試料とを別々に定量する工程であって、該工程が：

(i) 増幅産物の混合物を二つの結合種と別々に混合して、結合複合体反応物を形成し、ただし結合種は既知の試料配列と未知の試料配列の各々に特異的であり、

(1) 増幅された核酸と二価結合種との三分子複合体と相互作用する ECL 標識結合種；

(2) 増幅された核酸と ECL 標識結合種との三分子複合体と相互作用する二価結合種を含むものである、

(c) 上記結合複合体反応物を、増幅産物、ECL 標識結合種及び二価結合種の三分子複合体を形成するような条件下でインキュベートする工程；

(d) 上記三分子複合体を、二価結合種の残りの結合部位を介して固相に捕獲する工程、及び

(e) 上記既知の試料及び上記未知の試料について ECL を定量し、次いで、未増幅出発反応物中の未知の試料の量を測定する工程。

19. 該増幅が等温的である請求項 18 記載の方法。

20. 該試料が、核酸、増幅産物及び合成 DNA からなる群より選ばれる請求項 18 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

自立性配列複製電気化学発光核酸測定法

発明の分野

本発明は、特異的核酸配列の増幅、および電気化学発光標識結合種を使用するその配列の迅速な検出と定量のための強化された方法に関する。

発明の背景

試料中に存在する特異的核酸配列の検出と定量は、特異性の高い公知の診断方法である。この特異性は、特異的配列の知識と特異的で相補的なプローブの作成に基づく。

特異的核酸配列の検出と定量のための方法は、下記の特許に例示されている：

(1) 米国特許第5, 130, 238号は、特異的核酸配列を増幅するための改良方法に関する。この増幅方法の改良点は、単独またはウシ血清アルブミン(BSA)と組合せたジメチルスルホキシド(DMSO)の添加である；(2) 米国特許第4, 683, 195号は、核酸又はその混合物に含まれる任意の標的核酸配列を増幅し検出する方法に関する；(3) 米国特許第4, 683, 202号は、核酸又はその混合物に含まれる任意の目的とする特異的核酸配列を増幅する方法に関する；(4) 米国特許第4, 486, 539号は、1工程サンドイッチハイブリダイゼーション試験により核酸を同定する方法に関する；そして(5) WO 91/02814は、特異的核酸配列を増幅する方法に関する。

高度に特異的な核酸プローブの使用は、ある場合には囊胞性線維症のような遺伝子欠損の解析の場合のように、そのタンパク質が存在しない時に正確な結果を得ることのできる唯一の方法である。これはまた、HIVまたはヘルペスのように感染によりタンパク質がほとんどまたは全く生成されない潜伏性ウイルス感染の場合にも有用である。またこの核酸プローブの非常に高い特異性により、交差反応のため、およびこれらの感染性物質のアイソタイプ間の交差反応性の欠如のため、抗体で同定するのが困難な感染性物質の診断にも有用である。さらに、DNA配列の解析により、特異的なプローブの迅速で有効な選択が可能になるが、

これは抗体に基づく試薬では不可能である。

既存の核酸プローブ法の適用において最も困難でこれを制約するものは、特異的配列の複雑さと検出のための方法に時間がかかることがある。核酸の増幅により、低レベルの標的分子に関連した核酸プローブ法の制約は、上述の米国特許第5, 130, 238号；第4, 683, 195号；第4, 683, 202号において解決している。

ある場合には天然増幅の利用がこの問題を解決するのに用いられた。これは、米国特許第4, 851, 330号に開示されるように100, 000コピー／細胞以下のリボソームRNAの使用により例示される。感染性物質を培養する必要なく有効なものであるために、この方法は多くのインキュベーションと洗浄を要する迅速化学発光検出系を利用する。しかしこの方法も選択された細胞性病原体にのみ限定され、ウイルスまたは遺伝子欠損の場合には役に立たない。

先行技術に開示された増幅方法にもかかわらず、本発明は、試料の前処理（例えば、固相または膜への結合、試料の変性、油状物、タンパク質の抽出によるかまたはゲル電気泳動による試料の精製）を必要とせず、ハイブリダイズされ解析される増幅混合物にプローブを直接添加することができる。プローブ配列が修飾されるか、または酵素や増幅混合物中の条件により媒介される試料の分解を引き起こす可能性を考えると、これは驚くべきことである。例えば、DNAとRNA間のハイブリッド（プローブハイブリダイゼーションの基礎）を分解するRNAase Hの存在は、不純な増幅混合物をプローブ結合させる過程で特異的ハイブリッドを分解する。また、逆転写酵素の存在によりハイブリダイゼーション混合物中のプローブがプライマーとして使用され、特異的ハイブリダイゼーション複合体形成反応からプローブが除去されてしまうであろう。これらの問題の可能性に加えて、緩衝液は多くの化合物を含有し、これらの化合物はハイブリダイゼーションの問題を、また関与する特異的化学種（例えば、高レベルの塩MgCl₂、KCl、ヌクレオチド、ジチオスレイトール、スペルミジン、ジメチルスルホキシド、グリセロールおよびタンパク質）によるECLの生成の問題をも引き起こすかもしれない。このリストには、他の核酸プローブ法を妨害し、これらの方針を実施可能にするために除去する必要のある多くの物質が含まれる。

すなわち、驚くべきことに本発明ではこのような単純なプロトコールによる核酸プローブ測定法を実施することができた。

発明の要約

本発明は、迅速で工程が少なく従来の診断方法に比べて時間のかからない、増幅により生成する特異的核酸配列の検出のための診断方法に関する。この増幅は比較的一定の温度で起き、多くの一本鎖RNA種を生成する。この増幅に続いてプローブへのハイブリダイゼーションが、比較的一定の温度で行われ、次に結合したかまたは複合体を形成した電気化学発光種について解析される。このため、多数回のインキュベーションと多数回の洗浄、これに続く核酸の検出のための多数回のインキュベーションを要する他の系とは異なり、本診断方法は迅速であり、かつ感度が高い。

本発明の1つの面により、特異的核酸配列を増幅する方法が使用され、次に2つのオリゴヌクレオチドプローブ [1つは結合種を有する捕獲プローブ (すなわち、ビオチンまたは抗原)、他の1つは電気化学発光標識物を有するプローブ] が添加される。

本方法は一本鎖RNA、一本鎖DNA、および二本鎖DNAの合成を含む。一本鎖アンチセンスRNAは第二のプライマーのための第一鋳型である。一本鎖DNAは第一のプライマーのための第二鋳型である。二本鎖DNAは、第一鋳型の多くのコピーの合成のための第三鋳型である。第一のまたは第二のプライマーの配列は、特異的核酸配列の配列に充分に相補的であり、第一のまたは第二のプライマーの配列は、特異的核酸配列の配列に充分相同的である。第二のプライマーは第一RNA鋳型の3'末端に結合し、第二DNA鋳型を生成させる。第一のプライマーの3'末端は、第二DNA鋳型の3'末端にハイブリダイズする。第二鋳型は第一鋳型から除去され、相補的DNA鎖を生成させるのに使用される。生じた二本鎖DNAは第三鋳型として作用して多くの第一鋳型を合成し、この第一鋳型が順に上述のサイクルを繰り返す。この増幅方法は、下記文献により詳述される：キービッツ (Kievits) ら、35 J. Vir. Method. 273-286 (1991)；ブルイステン (Bruisten) ら、9 AID S Res. and Human Retroviruses 259-

265 (1993) ; EP 0 3 2 9 8 2 2 - A 2, WO 9 1 / 0 2 8 1 8, WO 9 1 / 0 2 8 1 4 (本質的に同様な方法が WO 8 8 / 1 0 3 1 5 にも記載されている)。インキュベーションの終了後、上述のように増幅からの試料をとり、相補的プローブの混合物と、ハイブリダイゼーション緩衝液中のプローブの1つと相補的な結合種中でコーティングされたビーズを添加し、次にあらかじめ設定した温度でインキュベーションを行い、第一鋳型へのプローブのハイブリダイゼーションと、結合相互作用 (すなわち、抗体-抗原またはビオチン-ストレプトアビシン) を介するビーズへの1つのプローブの結合を起こさせる。このインキュベーションの終了後、複合体が形成されるが、この複合体は、2つの異なるプローブ (1つは電気化学発光標識物を含有し、もう1つは結合種を含有する) にハイブリダイズする上記増幅反応から生成した第一のプローブよりなる。この複合体は、コーティングされたビーズとさらに複合体化して、プローブ結合種との相補的結合対を形成する。生じた複合体は、増幅された第一鋳型、電気化学発光標識物を有するプローブ、結合種を有する捕獲プローブ、および結合種のコーティングを有するビーズを含み (図1参照)、これら全てが各成分の特異的相互作用を介して複合体化している。NASBAサイクル中に生成するDNA配列はハイブリダイゼーションと検出のための標的になることも理解されるであろう。

特許請求される本発明の別の実施態様において、プローブとビーズ間の相互作用は、ビーズへの共有結合の形成により、または結合種 (この結合種が、共有結合または非共有結合的にコーティングされている場合に) 相互作用を介して、またはビーズを非共有結合でコーティング可能な分子種への共有結合を介して間接的に、ハイブリダイゼーション工程の前に作ることができる。この間接共有結合コーティングの例は、タンパク質のような担体に結合しているプローブの形をとり、次にビーズ表面に非共有結合的にコーティングすることができる。

別の実施態様において、増幅の試料は、ECL種で標識したプローブ、およびプローブと第一鋳型間に形成されたハイブリッドに特異的な結合種でコーティングされたビーズと混合される。例えば、DNAとRNAのこのようなハイブリッドは、特異的抗体を用いて捕獲される。1つの例は抗DNA:RNA抗体の使用である (マイルズ社 (Miles Inc.) 4, 833, 084)。このよう

な混合ハイブリッド分子を認識する他の抗体（例えば、RNAまたはDNAの、ホスホン酸、ホスホロチオ酸、アルキルまたはアリールホスホン酸に基づく核酸配列に対して作成した抗体）も有用であろう（ムラカミ（Murakami）ら、24 Biochemistry 4041-4046 (1985)、グレン・リサーチ（Glenn Research）（バージニア州スターリング（Sterling））からも入手可能）。これらの方法は、ハイブリダイゼーション時の新規分子種の形成に基づき、この新規分子種は、抗体に対するかつ抗体を作成するための結合種、またはこれらの分子種に対する他の結合種である。

さらに別の実施態様において、本測定法は出発物質中の核酸の量を定量するのにも使用することができる。これは、試料への反応中に増幅される特異的「スパイク」試料の添加により達成される。スパイクシグナルと試料シグナルの測定により比を計算することができ、元のスパイクレベルに基づき試料レベルの測定が可能になる。存在する可能性のある試料の量の範囲を越える量の範囲にわたる、標的と試料間で1:1の比で読める検量線を作成することができる、多くのスパイクの使用により、これは最も正確に測定される。これに基づく方法はよく理解されている：バン・ゲメン（Van Gemmen）ら、43 J. Vir. Methods 177-187 (1993)；シーベルトとラリック（Siebert and Larrick）、14 Biotechniques 244-249 (1993)；ピアタク（Piatak）ら、14 Biotechniques 70-80 (1993)。この定量方法は、ECL標識物の使用とNASBA増幅を含む方法の使用により提供される、検出と定量のための迅速で正確な方法の使用により改良される。

本発明はさらに、以下の工程よりなる、特定の核酸配列を検出する方法を提供する：

- (a) (i) 第一のオリゴヌクレオチドプライマー、
- (ii) プロモーターのアンチセンス配列よりなる第二のオリゴヌクレオチドプライマー、
- (iii) このプロモーターを認識するDNA依存性RNAポリメラーゼ、

- (iv) RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、
- (v) DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、
- (vi) 一本鎖または二本鎖 RNA または DNA を加水分解することなく RNA-DNA ハイブリッドの RNA を加水分解するリボヌクレアーゼ、
よりなる試薬を含有する单一の反応媒体を提供し、
- (b) この反応媒体中に、
 - (i) 第一のオリゴヌクレオチドプライマーが RNA 第一鑄型にハイブリダイズし、
 - (ii) RNA 依存性 DNA ポリメラーゼが RNA 第一鑄型を使用して、第一のオリゴヌクレオチドプライマーの伸長により DNA 第二鑄型を合成し、これによって RNA-DNA ハイブリッド中間体を形成し、
 - (iii) リボヌクレアーゼが、 RNA-DNA ハイブリッド中間体よりなる RNA を加水分解し、
 - (iv) 第二のオリゴヌクレオチドプライマーが DNA 第二鑄型にハイブリダイズし、
 - (v) DNA 依存性 DNA ポリメラーゼが第二のオリゴヌクレオチドプライマーを鑄型として使用して、 DNA 第二鑄型の伸長によりプロモーターを合成し；そして
 - (vi) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼがプロモーターを認識し DNA 第二鑄型を転写し、これによって RNA 第一鑄型のコピーを提供する、
サイクルが起こるような条件下で、特定の核酸配列または特定の核酸配列に相補的な配列よりなる RNA 第一鑄型よりなる RNA を提供し；
そして次に
- (c) 特定の核酸配列の目的の增幅を達成するのに充分な時間この条件を維持して次に、
 - (i) 電気化学発光種で標識した、 RNA 第一鑄型に相補的な少なくとも 1 つのプローブ配列、
 - (ii) 結合種で標識した、 RNA 第一鑄型に相補的な少なくとも 1 つの第二捕獲プローブ配列、

(iii) 第二プローブ配列に相補的な結合種でコーティングされたビーズ、を添加し；そして次に

(d) R N A 第一鑄型へのプローブのハイブリダイゼーションを可能にし、第二捕獲プローブ上の結合種とビーズ上の相補的結合種とを結合させてビーズ結合複合体の形成を可能にする温度と緩衝液の条件を提供し；そして次に

(e) 電気化学発光種を使用してビーズ結合複合体を検出する。

本発明はさらに、以下の工程よりなる增幅産物を検出する方法を提供する：

(a) 増幅産物を生成させる条件下で試料核酸を増幅し、

(b) この増幅産物を、

(i) 増幅核酸と二価の結合種との三分子複合体と相互作用する E C L 標識結合種；

(ii) 増幅核酸と E C L 標識結合種との三分子複合体と相互作用する二価の結合種、

よりなる 2 つの結合種と混合して結合複合体反応物を形成し；

(c) 結合複合体反応物を、増幅産物、E C L 標識結合種、および二価の結合種の三分子複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

(d) 二価の結合種の残りの結合部位を介して三分子複合体を固相に捕獲し；そして

(e) 固相に捕獲された E C L 標識物を定量する。

定義

本発明をさらに明確に理解するために、ある一定の用語を下記のように定義する：

“増幅産物”は、酵素反応を用いてサンプル核酸配列を複数回複写することによって形成された核酸配列を意味する。

“アニーリング”は、一本鎖核酸を含む溶液の温度が融解温度又は変性温度未満に低下するときに、相補的一本鎖核酸の間で生ずるハイブリッド形成を意味する。

“結合種”は他の分子種と結合することが知られる任意の種を意味し、通常は 1 対の種として定義されるが、高級複合体から、すなわち、結合する 3 又は 4 個

- から形成されることがある：すなわち、抗体：抗原又はオリゴヌクレオチド：抗体又はオリゴヌクレオチド：抗原又はDNA：DNA又はDNA：RNA又はRNA：RNA又はDNA：RNA：DNA又はビオチン-DNA：DNA-ECL標識又はレセプター：リガンド又はDNA結合タンパク質（例えば、制限酵素、lacリプレッサー）。

第1ヌクレオチド配列に対する“補体”は第1配列とのワトソン-クリック型ハイブリッド形成によって対となるような塩基を含む第2配列であることが周知である。したがって、デオキシリボ核酸（DNA）配列5' ATGC3'に対する補体は5' - G C A T 3'であることが周知である。二本鎖DNAに関して、二本鎖の各々は他方に対して相補的として又は相補的対として表される。補体及び抗補体なる用語も用いることができる。RNAへの転写がそれから進行する二本鎖DNAの鎖の同定に関して、転写鎖は一般にプラスとして表示され、その補体はマイナスとして表示される（“+”又は“-”）、又は転写鎖は一般にセンス鎖として表示され、その補体はアンチセンスとして表示される。相補的な全ての塩基対を有する他方に対してそれぞれハイブリッド形成した2鎖は相互に100%相補的である。5%の非相補的塩基を有するそれぞれ他方にハイブリッド形成した2鎖は、95%の相補的である（又は、2鎖は95%相補性を有する）。さらに、核酸配列が、三本鎖ハイブリッド内で特定の形式で相互に相補的と考えられる3鎖の特定相互作用に基づく三本鎖ヘリックス構造を形成しうることも理解されるであろう。

“検出”又は“定量”なる用語は“測定”と呼ばれ、定量が基準組成物の用意と、較正とを必要とすることは理解されるであろう。

“電気化学的発光（ECL）種”は、電気化学的発光することが知られる、任意の化合物を意味する。

“電気化学的発光（ECL）標識”は、電気化学的に作用されたときに発光種になる標識である。電気化学的発光方法は化学的発光方法の改良である。これらの方法は問題の分析物の存在及び濃度を高感度でかつ正確に測定する。このような方法では、発光を誘発するために、サンプルをボルタンメトリック作用電極に暴露させる。標識によって生じた光が測定され、分析物の存在又は濃度を表示す

る。このようなECL方法はBard等の“発光性金属キレート標識と検出方法”なる名称のPCT出願No. US85/02153と; Masssey等の“電気化学的発光分析”なる名称のPCT出願No. US87/00987と; “電気化学的発光成分とそれらの利用方法”なる名称のPCT出願No. US88/03947、公報No. WO89/04302と; Hall等の“電気化学的発光測定を実施するための方法及び装置”なる名称の米国特許出願No. 744,890(1991年8月14日出願)と; ZoskiとWoodwardの、“電気化学的発光現象の測定の実施装置”なる名称のPCTNNo. US89/04854(同時係属EPO出願No. 89/912913.4、公報No. 0441880に対応)に開示される。

ECLタグ(tag)の例はタグNHS(N-ヒドロキシースクシンイミド)及びタグホスホラミジットである。タグNHSエステルは、NHSエステルと反応してアミド結合を形成することができる遊離アミノ基を含む物質を標識するために有用である(例えば、WO86/02734を参照)。タグホスホラミジット(本明細書に援用される、Gudibande等の“DNAプローブ分析のための改良された電気化学的発光標識”なる名称の米国特許出願No. 805,537f)は、ホスホール結合、特にホスホジエステル結合を形成する遊離アミノ基、スルフヒドリル基又はヒドロキシル基を含む物質を標識するために有用である。

“ECL分析緩衝液”は、ECL分析器の電極における電気化学的反応のために必要であるトリプロピルアミンを含む、一般的な希釀剤である。

“ECL希釀剤”は、貯蔵のために不安定なバイオ分子(biomolecule)を含む溶液の希釀に用いられる希釀剤試薬である。

“ECL装置”は電気化学的発光に基づく分析を実施するための任意の装置である。このようなECL装置はBard等の“発光性金属キレート標識と検出手段”なる名称のPCT出願No. US85/02153と; Masssey等の“電気化学的発光分析”なる名称のPCT出願No. US87/00987と; “電気化学的発光成分とそれらの利用方法”なる名称のPCT出願No. US88/03947、公報No. WO89/04302と; Hall等の“電気化学的発光測定を実施するための方法及び装置”なる名称の米国特許出願No. 74

4, 890と; Zoski, G. と S. Woodward の, “電気化学的発光現象の測定の実施装置”なる名称のPCT No. US 89/04854 (同時係属EPO出願No. 89/912913. 4、公報No. 0441880に対応) に開示される。

ポリヌクレオチド配列間の“相同”は、各配列間の配列類似度を意味する。配列が同じである2鎖は100%配列相同を有する。配列が5%異なる2鎖は95%配列相同を有する。2鎖AとBの間の相同度が大きいほど、Aと、Bの補体との間の相補度は大きくなる。

“ハイブリッド形成”は相補的一本鎖核酸からの二本鎖核酸の形成を意味する。ハイブリッド形成は、充分に相補的な一本鎖DNA及び/又はRNAの間で行われて、DNA:DNA、DNA:RNA、又はRNA:RNA又はDNA:RNA:DNA又はビオチン-DNA:RNA:DNA-ECL標識を形成する。これはまた、例えばホスホネート、ホスホロチオエート、アルキル又はアリールホスホネートに基づく核酸配列のような修飾天然化学を用いて結合されるヌクレオチドの配列を含むこともできる (Murakami等, Biochemistry, 24 (1985) : 4041~4046, Glenn Research, ヴァージニア州, スターリング)。

“標識”又は“標識した”なる用語は、核酸に適用する場合に、問題の核酸がECLと発光、化学物質を同定する分析、放射能又は特異的結合性を含むことができる、その性質によって検出可能である部分に結合することを意味する。したがって、“標識”なる用語は、他に特に指示しないかぎり、リガンド部分を含む。

“核酸”なる用語が、本明細書に述べるような修飾塩基を含む又は含まない、DNA又はRNA、染色体又はそのフラグメントを含む、任意の長さのポリヌクレオチドを意味することも、技術上周知である。

“ヌクレオチド”は、ホスフェートに加えた、糖 (DNAに対してはデオキシリボース、RNAに対してはリボース) に加えて、下記塩基:アデニン、シトシン、グアニン、チミン又はウラシルの少なくとも1つを有するものである。DNA重合反応のモノマーを用意するために、典型的に全体で4個のデオキシヌクレ

- ・オチドトリホスフェートが必要である。本明細書で定義するヌクレオチドは、

鋳型に対するポリメラーゼの作用を改良するために用いられる、例えば5-メチル-*d* C T P 及び7-デアザ-*d* G T P のような修飾塩基を含むこともできる。本明細書で用いるヌクレオチドなる用語は、ビオチン及びジゴキシゲニンに結合した塩基 (Boehringer (インジアナ州, インジアナポリス) からのジゴキシゲニン-11-UTP) と、ビオチン-21-UTP 及びアミノ-7-*d* UTP (Clontech, カルフォルニア州, パロアルト) と、ECL標識ヌクレオチド (図6と7参照) をも含み、これらはプライマー又はプライマー伸長生成物に増幅中に直接組み込まれて、増幅配列に選択的に結合する。

“オリゴヌクレオチド”は少なくとも2個のヌクレオチドから形成される配列である。

“ポリヌクレオチド”は長いオリゴヌクレオチドであり、R N A 又はD N A のいずれかであることができる。

オリゴヌクレオチドなる用語は一般に、小さい核酸鎖を表示するために当該技術分野で用いられ、“ポリヌクレオチド”なる用語は一般に、D N A またはR N A 、染色体又はそのフラグメントを含めて、大きい核酸鎖を表示するために当該技術分野で用いられるが、本明細書におけるいずれの用語の使用も、故意に表示しないかぎり、サイズの限定又は説明はない。

“プライマー”は、問題の配列の一部に相補的であるオリゴヌクレオチドの比較的短いセグメントである (問題の配列とは、大きい核酸配列内のサブフラグメントでありうる)。プライマーは得られる伸長生成物の5'末端を表す。鋳型鎖上の問題の配列に対してその3'末端において相補的であるプライマーは、この3'末端を鋳型へのハイブリッド形成時にポリメラーゼによって作用させることができる。3'末端に対する修飾がオリゴヌクレオチドのプライマーとして機能する能力に影響を与えることは周知である。1例はD N A配列決定における、したがってD N Aポリメラーゼの作用を妨害するジデオキシヌクレオチドの組み入れである。プライマー長さが特定の用途に依存するが、20~30塩基対が通常の長さであることは周知である。また、周知であるように、ハイブリッド形成の

上首尾な実施のためにプライマーが完全に相補的である必要はない。プライマーが不完全に相補的である場合には、プライマー配列を組み入れた伸長生成物が得

られ、後のサイクル中にプライマー配列に対する相補性が鋳型配列中に組み入れられる。したがって、鋳型の補体の配列とは異なる配列を有する、適当に選択されたプライマーを用いて、インビトロで突然変異を誘発させることができることが周知である。プライマーは、上記で定義したような、任意の周知の修飾又は標識塩基を含めて、技術上周知の任意の核酸塩基を組み入れることができるので、プライマー伸長生成物はこれらの特徴を組み入れて、プライマー伸長生成物の分離及び検出を可能にことができる。プライマーに有利に結合するタグ又はマーカーには、ECL、蛍光又は発光タグ、同位体（例えば、放射性同位体又は磁気共鳴）標識、色素マーカー、酵素マーカー、抗体によって検出可能な抗原決定基、又は例えばストレプトアビジン被覆ビーズのような、他のインジケータ部分をプライマー若しくはプライマーを組み込む核酸配列に特異的に結合させることができる結合部分（例えば、ビオチン）がある。標識した又はタグ付き增幅生成物が形成されるときに、この增幅生成物をタグ又は標識の特徴性によって検出することができる。

“プライマー伸長生成物”なる用語は、プライマーの伸長中に得られる、鋳型の補体と共に、プライマー配列を意味する。

“プローブ”は問題の標的核酸配列に相補的な配列を有し、プローブ一標的二本鎖(duplex)の検出を可能にする付加的特徴を有する、一本鎖又は二本鎖核酸である。プローブ及び／又は核酸が二本鎖であるならば、ハイブリッド形成が起こりうる前に、二本鎖核酸が鎖分離を受けなければならないことを、当業者は理解するであろう。三本鎖形成を用いる場合には、二本鎖標的をハイブリッド形成前に一本鎖にする必要がないことは考えられる。

プローブは付着したタグ又はマーカーによって検出可能になる。プローブに結合するタグ又はマーカーには、蛍光、ECL又は発光タグ、同位体（例えば、放射性同位体又は磁気共鳴）標識、色素マーカー、酵素マーカー、抗体によって検出可能な抗原決定基、又は例えばストレプトアビジン被覆ビーズのような、他の

インジケータ部分をプライマー若しくはプライマーを組み込む核酸配列に特異的に結合させることができる結合部分（例えば、ビオチン）がある。標識した又はタグ付きプローブー標的二本鎖が形成されるときに、この二本鎖(duplex)をタグ

又は標識の特徴性によって検出することができる。或いは、以下の実施例においてECL分析に関して述べるように、その結合部分を有するプローブはハイブリッド形成及び二本鎖形成を介して標識標的の捕獲を可能にし、標識又は他の技術上周知手段による検出を可能にする。

“サンプル”は核酸を含む混合物を意味する。

“配列”（例えば、配列、遺伝子配列、ポリヌクレオチド配列、核酸配列）はポリヌクレオチド鎖（例えば、5'及び3'方向から読み取る）中に存在する実際に数えられる塩基（例えば、リボース又はデオキシリボース）と、これらの塩基の相互に関する相対的な位置とを意味する。

“一本鎖プライマー(single primer)”は、問題の標的核酸配列と選択的にハイブリッド形成するように設計された、一本鎖の非対合特異的又は選択されたプライマーを意味する。

“特異的（特定の）核酸配列”は、プローブとして用いることができる又は増幅することができる一本鎖又は二本鎖核酸を意味する。

“特異的（特定の）又は選択された”核酸配列は、他の差異(difference)配列から識別可能な（すなわち、ハイブリッド形成分析によって）特定の配列を意味する（例えば、特異的ヌクレオチド配列5' - A T G C C C - 3'は5' - A A G C C C - 3'と同じ配列ではない）。

特異的又は選択されたプライマーは、プライマーを鑄型配列の3'末端に相補的にする又はほぼ相補的にすることによって所望の結果を得るために、特定の鑄型配列とハイブリッド形成するように設計されたプライマーである。特異的プライマーは、標的鑄型配列が多く他の核酸配列の混合物中に存在するとしても、選択的に所望の結果を得ることができる。

特異的又は選択されたプライマーは、相補的（プライマーに対して）アダプター末端配列が結合した任意にDNA配列に無差別にアニールする“ユニバーサル

“(universal)プライマー”とは区別される。ユニバーサルプライマーに関しては、存在する全ての核酸配列へのアダプターのランダムな結合を避けるために、問題の核酸を単離させるか、又は問題の所望のDNA配列のみに連結操作を導くよう注意しなければならない。

“鎖(strand)”は一本鎖核酸配列である。したがって、二本鎖染色体、染色体フラグメント又は他の核酸配列は相補的な一本鎖に分離することができる。

“鎖分離”は二本鎖核酸の2本の相補的な一本鎖ポリヌクレオチドへの転化を意味する。この分離プロセスは酵素仲介分離（例えば、酵素ヘリカーゼによる）、物理-化学的分離（pH、イオン濃度等）、熱変性としても知られる熱分離を含めた周知方法を用いることができる。熱変性（“融解”とも呼ばれる）は、ポリヌクレオチドを保有する溶液の温度を上げることによる、二本鎖ポリヌクレオチド（完全に又は部分的に二本鎖）を少なくとも2本の一本鎖ポリヌクレオチドに分離することである。

“充分に相補的”とは、2種の核酸が特異的に相互作用することができ、DNAのプライマー依存性及び鋳型指向性合成又は核酸配列へのプローブ結合を可能にすることを意味する。

“鋳型”は、それによって相補的コピーが合成される、核酸の任意の配列である。これは一般にDNAからのDNA複製、DNAからのRNA転写又はRNAからのDNA逆転写であることができる。DNA鋳型はDNAポリメラーゼ反応による相補的プライマー伸長に関する配列情報を与える。RNA鋳型は逆転写酵素によって触媒されるアナロガス(analogous)反応による相補的DNAプライマーの伸長に関する配列情報を与える。技術上周知であるように、鋳型は一本鎖形又は二本鎖形のいずれでも存在しうる。鋳型が二本鎖形で増幅プロセスに加わるならば、鋳型鎖はそれが第1熱変性サイクルによって変性するまで、その相補的プライマーとハイブリッド形成しない。鋳型が既に一本鎖形で増幅プロセスに加わるならば、プライマーはその相補的鋳型と、第1熱変性工程の前に、ハイブリッド形成する（熱サイクリングを用いる場合にはアニーリングと表現される）。

図面の簡単な説明

- ・ 図1は核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。
- ・ 図2は代替え核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。
- ・ 図3は代替え核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。
- ・ 図4は代替え核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。
- ・ 図5は代替え核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。

図6は代替え核酸ハイブリッド形成プロセスの一般的な説明である。

図7はECL標識ヌクレオチドである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、特定の核酸配列を増幅する方法及びその迅速な検出並びに定量に関する。この増幅は、DNA及びRNAについての交合合成を含む。かかる方法では、一本鎖アンチセンス(+)RNAを一本鎖DNAに変換し、引続いて二本鎖DNAに変換し、オリジナルの一本鎖RNAの複数のコピーを合成するための機能的な鋳型(テンプレート)となる。第一及び第二のプライマーが増幅工程で用いられる。第一のプライマー又は第二のプライマーの配列は、特定の核酸の配列中の一つの配列に対して十分に相補的であり、また第一のプライマー又は第二のプライマーの配列は、特定の核酸の配列中の一つの配列に対して十分に相同性である。特定の核酸配列が二本鎖の場合には、プライマーは相補的で且つ相同性である。増幅される特定の配列の検出は、増幅生成物DNAあるいはRNAとハイブリダイズするプローブ配列を使用することによって達成される。これらのプローブ配列は、特定の核酸配列中の一つの配列に対して一般的に十分に相補的であり、従って、その結果、特定のハイブリッドが形成される。次いで、これらのハイブリッドは、ECL検出装置を使用することによって検出され、この装置では電極表面において制御された方法でECLラベルが光を産生し、それによって検出及び定量が可能となる(図1、2、3、4、5及び6)。

これらの増幅生成物のアッセイは、多くのフォーマットを使用して可能となる。好ましい方法では、増幅後に二つのプローブ分子が使用され、一つのプローブは結合種(ビオチン、ジゴキシン、フルオレセインなど)でラベル化され、他のプローブはECLラベル(Ruキレート、Osキレート、Re、Rhなど)でラ

ベル化される。これらのプローブは、オリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーを产生する増幅反応後のサンプルに添加される。これらのプローブは、オリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーに対して相補的であり、又は十分に相補的である。プローブと増幅された核酸の混合物は、オリジナルの一本鎖RNAまたはDNAの複数のRNAコピー及び特定のプローブに対して選択された温度並びに緩衝液成分のコントロール下で、当業者に知られ

た方法を用いて、ハイブリダイズする。これらのハイブリッドの形成により、両者のプローブは同じハイブリッド複合体中において結合される。次いで、これらは、マグネットックビーズの添加により、インキュベーション系から捕獲される。マグネットックビーズは、捕獲されるプローブ上の結合種に結合する結合種によって被覆されている（図1）。例えば、プローブ上にビオチンが結合されている場合には、ストレプトアビシン又はアビシンがマグネットックビーズ上に被覆され、プローブ上にジゴキシゲニンが結合されている場合には、ジゴキシゲニンに対する抗体がビーズ上に被覆される。次いで、ハイブリッド複合体とビーズの混合物は、結合種間の結合相互作用を促進するような公知の条件下でインキュベートされる。結合種同志の結合条件は、当業者に周知であり、例えばビオチンとストレプトアビシン、及び抗原と抗体の相互作用については周知である。

ハイブリッド複合体をマグネットックビーズ上に捕獲後は、サンプルは、サンプルチューブに極めて接近して用いられているマグネットによるビーズの捕獲によって洗浄することができ、あるいはより理想的には、サンプルを直接ECL装置に導入してサンプル化し、そこでマグネットックビーズとその結合複合体が捕獲され、次いで、表面に結合したECL標識（ラベル）の電気化学反応に付すことができる。この電気化学反応から產生される光は、測定されて、ビーズとの複合体を形成したECLラベル量の決定に使用される。ある条件下でビーズに結合したECLラベルの相対量を決定することによって、増幅されて產生されたオリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーの量を決定することができる。特定のDNA又はRNAの増幅レベルに関するこの情報によって、サンプルD

NA又はRNAについて特定のDNA又はRNAの存在を診断することにより、サンプル中の遺伝子あるいは生物の存在を決定することができる。

上記した方法とは別の方法として、上記したと同様にしてハイブリッド複合体を形成することができ、但しプローブオリゴヌクレオチドに直接結合したECLラベルなしで該ハイブリッド複合体を形成できる結合種でラベル化した2つのオリゴヌクレオチドを使用することができる。かかる別のフォーマットでは、ハイブリッド複合体のためにハイブリダイズする前か、あるいは結合ペアー複合体形成後のいずれかに、ECLラベルをハイブリッド複合体に連結する。このような

システムの例としては、ジゴキシン（結合種又は抗原）でラベル化されたプローブと、ビオチン（結合種）でラベル化されたプローブの使用が挙げられる。これら2つのプローブは、増幅工程で產生されたオリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーとのハイブリッド複合体を公知の条件下で形成する。かかるハイブリッド複合体を形成後、ECLラベル化抗ジゴキシン抗体（結合種又は特定抗体に対して相補性）及びストレプトアビジン（結合種に対して相補性）で被覆したマグネチックビーズを、結合相互作用を形成する公知の条件下で（pH 4.9, 1 mM-2 M塩、0-10%洗浄剤）、添加することにより、抗体への抗原の結合によりECLラベルのハイブリッド複合体への結合が生じる。また、ストレプトアビジンのビオチンへの結合相互作用により、複合体はビーズの表面上に捕獲される。次いで、増幅工程において產生されたオリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーにハイブリダイズしたプローブの得られる大きな複合体を、ECLアライザーを使用することによって分析する。

あるいは、ECL種でラベル化された特定の複合体の形成は、増幅工程で產生されたオリジナルの一本鎖RNA又はDNAの複数のRNAコピーにハイブリダイズさせた時に結合種を形成するECL種でラベル化されたプローブ配列の使用により達成される。次いで、このハイブリッド複合体又は結合種は、マグネチックビーズで被覆された相補性結合種を使用することによって捕獲される。例えば、DNA:RNAハイブリッドに対する抗体である（図2）。

あるいは、増幅は結合種を用いて行うことができ、結合種は、増幅工程で產生

された複数のDNA及び/又はRNA分子に取り込まれる。かかる方法は、当業者に周知である。かかる例としては、結合種を含むように修正されたプライマー（プライマー2、U. S. Patent No. 5,130,238）を使用することが挙げられ、かかるプライマーは、RNA種とプライマー2に対するRTの作用により、DNA+鎖に取り込まれる。DNA+生成物は、結合種分子に共有結合したDNA+種である。次いで、このDNA結合種分子は、ECLラベル化プローブにハイブリダイズされ、相補性結合種を介してビーズ上に捕獲されてECL分析に付される（図4）。同様のフォーマットでは、DNA結合種分子はハイブリダイゼーションによりビーズ上に捕獲され、次いで、ECLラベルでラ

ベル化された相補性結合種により、DNA結合種に結合される。結合種の例としては、ビオチンとその相補性結合種ストレプトアビシンが挙げられる。RNA-及びDNA+（図1）は、例えば、ビオチンとジゴキシゲニン（ジゴキシゲニン-11-UTP、Boehringer Mannheim, インディアナポリス、インディアナ州）、ビオチン-21-UTPとアミノ-7-dUTP（クローンテック、パラアルト、カリフォルニア州）、ECLラベル化ヌクレオチド（図7）などの結合種を増幅反応に導入するように修正された前記した如きヌクレオチドの取り込みによって、結合種でラベル化できることが理解されるであろう。次いで、DNA+及び/又はRNA-結合種分子は、上記したアッセイフォーマットに使用できる（図3）。

これらのアッセイに使用されるビーズは、典型的には、ストレプトアビシンで被覆されたDynal M450、M280などであるが、常磁性で0.5 μmから10 μmの範囲のサイズであれば他のビーズも使用することができる。捕獲されたオリゴヌクレオチドは、結合種のための必要事項を省略できるこれらのビーズに結合することができる（図5）。

一般的に本発明を記載したが、以下の例を説明のために含める。しかし、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

例1：オリゴヌクレオチドの合成および標識

オリゴヌクレオチドは、 β -シアノエチルホスホラミダイト化学 [Beaucage & Caruthers 22 Tetrahedron Lett. 1859-62(1982)] を用い、Applied Biosystems (San Jose, California) 自動化オリゴヌクレオチドシンセサイザーによって作製した。5'末端に対するオリゴヌクレオチドアミノ修飾は最終カッティング工程で起こった。アミノ修飾剤はClontech (San Diego, California) から供給された（米国特許第5, 141, 813号参照）。得られた5'修飾オリゴヌクレオチドはすべてアミノ基に6炭素スペーサーアームを含有し、(C₆, N H₂)で示す。

合成オリゴヌクレオチドは、すべて、BIOGEL™ P6 (Bio-Rad Labs, Richmond, California) カラム上ゲルろ過によって精製して夾雜するアミノ基を除去した。ビオチンはNHS-ビオチン (Clontech San Diego, California) を用いてオリ

ゴヌクレオチドの5'-アミノ基を介して導入した。tag-NHSエステル標識 (Ruトリスピリジル複合体のNHSエステル) は修飾されたオリゴヌクレオチドのアミノ基を介して以下のように導入された。100 μ lのPBS (pH 7.4) 中オリゴヌクレオチド (0.1 μ mole) を、DMSO中に溶解したtag-NHSエステル標識0.5 μ moleと、一夜、室温暗所で反応させた。オリゴヌクレオチドはエタノール沈殿によってこれらの標識反応混合物から回収した。オリゴヌクレオチドに対する修飾および標識は以下のように指示する。ビオチン：リンカー：「オリゴヌクレオチド」は5'-アミノ基で修飾し、ついでビオチンNHS試薬と反応させて5'-ビオチン化オリゴヌクレオチドを生成させたオリゴヌクレオチドを示す。また、R：リンカー：「オリゴヌクレオチド」は5'-アミノ基で修飾し、ついでルテニウムトリスピリジンNHS試薬と反応させて5'-ルテニウムキレートオリゴヌクレオチドを生成させたオリゴヌクレオチドを示す。また、「オリゴヌクレオチド」：リンカー：Rは3'-アミノ基で修飾し、ついでルテニウムトリスピリジンNHS試薬と反応させて3'-ルテニウムキレートオリゴヌクレオチドを生成させたオリゴヌクレオチドを示す。

P012アッセイのプローブは次の通りとした。

OT1, TTAAATTTCCCATTAGCCCTATTGAGACT HIV1 Genbank; HIV BH102 #1900-1929

および

OT2, AGAAATCTGTTGACTCAGATTGGTTGCACT HIV1 Genbank; HIV BH102 #1869-1898.

これらには以下の修飾を行った。

50T1, ビオチン：リンカー：TTAAATTTCCCATTAGCCCTATTGAGACT

350T1, R：リンカー：TTAAATTTCCCATTAGCCCTATTGAGACT：リンカー：R

50T2, ビオチン：リンカー：AGAAATCTGTTGACTCAGATTGGTTGCACT

350T2, R：リンカー：AGAAATCTGTTGACTCAGATTGGTTGCACT：リンカー：R

増幅はJ.Vir.Methods 35(1991): 273の記載の通りとした。

G a g 3 アッセイのプローブは次のようにした。

H I V 1 g a g 遺伝子の分析用配列,

Genbank HIVBH102 #1139-1167

AKZ01 TA GAA GAA ATG ATG ACA GCA TGT CAG GGA (29塩基)

HIVBH102 #1208-1236

AKZ02 CA ATG AGC CAA GTA ACA AAT ACA GCT ACC (29塩基)

は以下の g a g 3 アッセイのために

AKZ01, ビオチン：リンカー：TA GAA GAA ATG ATG ACA GCA TGT CAG GGA (29塩基) および

AKZ02, R：リンカー：CA ATG AGC CAA GTA ACA AAT ACA GCT ACC：リンカー：R (29塩基) として作製した。増幅はVan Gemenら, 43 J.Vir.Methods 177-187(1993)の記載に従って実施した。

定量的 g a g アッセイのための他のプローブは以下の通りとした。

プローブ A : TGT TAA AAG AGA CCA TCA ATG AGG A (25塩基) genbank ref.HIV BH102 #710-734.

プローブ B : GAA TGG GAT AGA GTG CAT CCA GTG CAT G (29塩基) genbank ref.HIVBH102 #742-769.

プローブ C : GAC ACT GTA GAT AGA TGA CAG TCG (24塩基), Van Gemenら, J. Vir.Methods(1993)に記載の定量のための対照配列。

これらのプローブ A, B および C の使用は次のように行うことができる。

Aを捕獲, B, Cを検出に使用するか, またはB, Cを捕獲, Aを検出に使用する。

必要なプローブを発生させるためには, 以下の配列にビオチン (結合種) およびルテニウムトリビピリジン複合体 (ECL標識) の導入を行った。

プローブAは,

AKZ0-A2, R : リンカー : TGT TAA AAG AGA CCA TCA ATG AGG A : リンカー : R およびAKZ0-A1, ビオチン : リンカー : TGT TAA AAG AGA CCA TCA ATG AGGとした。

プローブBは,

AKZ0-B2, R : リンカー : GAA TGG GAT AGA GTG CAT CCA GTG CAT G : リンカー : R およびAKZ0-B1, ビオチン : リンカー : GAA TGG GAT AGA GTG CAT CCA GTGCA TGとした。

プローブCは,

AKZ0-C2, R : リンカー : GAC AGT GTA GAT AGA TGA CAG TCG : リンカー : R およびAKZ0-C1, ビオチン : リンカー : GAC AGT GTA GAT AGA TGA CAG TCGとした。

この場合Rはオリゴヌクレオチド上のアミノ基に反応させたルテニウムトリスビピリジンN-ヒドロキシスクシンアミドエステルである。アミノ基は合成時に導入された。

例2:ストレプトアビシン磁性ビーズの調製

15mgのB S A (2~3mlのP B S中) に, 50 mg/mlのビオチン-x-N H S (Clontech San Diego, California) を含有する105 μ lのジメチルスルホキシドを加え, ついで室温で30分間混合してインキュベートした。30 μ lの1Mグリシンを添加して反応を停止させ, 室温で10分間インキュベートした。反応混合物をゲルろ過クロマトグラフィー (Bio-Gel P6, Bio-Rad Labs, Richmond, California) によって精製した。このビオチン-B S Aは0.2 μ mフィルターおよびシリジを用いてろ過した。10mlの0.2 M炭酸/重炭酸ナトリウム緩衝液p H 9.06中5mgのビオチン-B S Aを300mgのDYNABEADSTM (DYNAL No.14002) に加えた (DYNABEADSはDYNAL, Great Neck, New Yorkの商標である)。ビーズは

• (i) Dynal M-450 Dynabeads, $4.5\mu\text{m}$ 径の超常磁性粒子, 30 mg/ml, Dynal, 45 North Station Plaza, Great Neck, New York 11021より入手: または

(ii) Dynal M-280 Dynabeads, $2.8\mu\text{m}$ 径の超常磁性粒子, 10 mg/ml, Dynal, 45 North Station Plaza, Great Neck, New York 11021より入手のいずれかからなり, 炭酸塩/重炭酸塩で洗浄した. この混合物をボルテックス攪拌し, 一夜室温で混合しながらインキュベートした. ビーズを磁性により分離し, ついで10 mlのECL希釀液 (H_2O 中 37.5 mM KH_2PO_4 , 109.2 mM K_2HPO_4 , 3 H_2O , 151.7 mM CaCl_2 , 0.65 mM Na_3N , 0.43 mM ウシ血清アルブミン) および $100\mu\text{l}$ の tRNA (10 mg/ml) を添加した. この混合物を混合しながら室温で 3 ~ 4 時間インキュベートした. ビーズを 10 ml の ECL 希釀液で 1 回洗浄し, 10 ml の ECL 希釀液および $100\mu\text{l}$ の tRNA (10 mg/ml) に再懸濁した. この混合物を混合し, 一夜 2 ~ 6 °C でインキュベートしてビーズ上のタンパク質を安定化させた. ビーズを磁性によって分

離し, 次に 15 mg のストレプトアビシン (Scripps Laboratories, San Diego, California, カタログ番号 S1214) を含有するリン酸緩衝食塩溶液 (PBS) 10 ml 中に懸濁し, ついで 1 時間混合した. ビーズを 10 ml の ECL 希釀液により 4 回, 各回 5 分間混合して洗浄した. 最後に, ビーズを 29.7 ml の ECL 希釀液ならびに $300\mu\text{l}$ の tRNA (10 mg/ml) に, 最終濃度が 10 mg/ml 粒子 + $100\mu\text{g/ml}$ tRNA になるように再懸濁した.

例 3 : P o l 2 アッセイ

プローブ溶液 I : 50 回のアッセイ用に

$50\mu\text{l}$ の 350T1 (ECL オリゴ, $1\mu\text{g/ml}$)

$50\mu\text{l}$ の 50T2 (ビオチン標識オリゴヌクレオチド, $2\mu\text{g/ml}$)

を配合した.

增幅はプライマー OT188 および OT42 を用い, J. Vir. Methods 35 (1991): 273 に記載の方法に従って行った.

サンプルは 2 つの方法のいずれかによって調製した.

A) 増幅からのサンプル $4\mu\text{l}$ に, 0.1 % SDS, 20 mM EDTA を含有す

るAKZO緩衝液 $16\mu\text{l}$ を加え, 95℃に5分間加熱する。

B) サンプル $20\mu\text{l}$ に 1.25 % SDS, 240 mM EDTA $1.8\mu\text{l}$ を加え, 95℃に5分間加熱する。

アッセイチューブ中で以下を混合する。 $5\mu\text{l}$ のプローブ溶液Iおよび $5\mu\text{l}$ の上記サンプル。これらのサンプルを50℃で30分間インキュベートしついで $5\mu\text{l}$ のビーズ ($20\mu\text{g}$ Dynal 450) を加えて60分間混合した。この混合物に $485\mu\text{l}$ のECLアッセイ緩衝液を加え, サンプルをECLアナライザーでアッセイした。試験を行ったサンプルは, 'NT' 鎌型を含まない対照, 'A' 10コピーのHIV1および' B' 10,000コピーのHIV1であった。これらは増幅反応液からの $1\mu\text{l}$ アリコートであった。

結果は以下の通りであった。

サンプル	ECLシグナル
バックグラウンドシグナル	204
NT	1908
	1884
	1913
A	1952
	1862
	1911
B	175679
	179986
	167539

これらの結果は, 増幅およびECLによりHIV1配列が迅速かつ高感度に検出できることを証明した。

例4: gag3およびP012アッセイ

上述のアッセイ系を改良するために, 本発明者らはさらにプローブおよびビーズを用いて, 従来ない範囲でのアッセイを提供した。増幅は例3と同様にして取り出し, gag遺伝子については35 J.Vir.Methods 273(1991)に記載のプライマ

—OT83およびOT82を使用した。

プローブ溶液 I : 50回の p o l 2 アッセイ用に

50 μ lの350T1 (E C L オリゴ, 20 μ g/ml)

50 μ lの50T2 (ビオチン標識オリゴヌクレオチド, 20 μ g/ml)

を配合した。

プローブ溶液 2 : 50回の g a g 3 アッセイ用に

50 μ lのAKZ02 (E C L オリゴ, 20 μ g/ml)

50 μ lのAKZ01 (ビオチン標識オリゴヌクレオチド, 20 μ g/ml)

を配合した。

サンプルは 2 つの方法のいずれかによって調製した。

A) 増幅からのサンプル 4 μ lに 0.1% S D S, 20mM E D T A を含有する A K Z O 緩衝液 16 μ lを加え, 95°C に 5 分間加熱する。

B) サンプル 20 μ lに 1.25 % S D S, 240 mM E D T A 1.8 μ lを加え, 95°C に 5 分間加熱する。

初期アッセイプロトコールではアッセイチューブ中で以下の順序で混合する。

5 μ lのプローブ

5 μ lのサンプル。

50°C で 30 分間インキュベートし, ついで 10 μ l (40 μ g) のビーズを加えて 60 分間振盪した。これらのサンプルを 485 μ l の E C L アッセイ緩衝液で希釈して, E C L アナライザーでアッセイした。試験を行ったサンプルは, 'G11', 10¹ コピーの H I V 1 ; 'G10', 10⁰ コピーの H I V 1 ; 'G9', 10⁰ コピーの H I V 1 ; 'G8', 10⁰ コピーの H I V 1 ; およびハイブリダイゼーションバックグラウンドのための' B B ' 緩衝液ブランクとした。

これらは, この数の R N A 分子を含む試験サンプルとしてこのアッセイにおいて生成させた純粋な R N A のサンプルであった。

結果は以下の通りであった。

サンプル	E C L シグナル
バックグラウンドシグナル	82
G11	249559
	252442
G10	12783
	16059
G9	1427
	1429
G8	334
	330
BB	250
	250

また、出発H I V 1配列の10,000コピーを用い、増幅後のゲル電気泳動に基づいて $1\mu\text{l}$ あたり 5×10^4 コピーと推定された増幅反応からのp o l 2サンプルをアッセイした。このサンプルでは、このサンプルでの新たなアッセイフォーマ

ットの範囲を決定するために希釈した。サンプルは、'P10', 5×10^4 ; 'P9', 5×10^3 ; 'P8', 5×10^2 ; 'P7', 5×10^1 ; 'P6', 5×10^0 、および増幅サンプルを含まないアッセイにおける非特異的結合の対照である'BB'サンプルとした。

結果は以下の通りであった。

サンプル	ECLシグナル
バックグラウンドシグナル	82
P10	58762
	62039
P9	4696
	4391
P8	677
	665
P7	330
	319
P6	254
	263
BB	250
	250

この実験は、この新規なアッセイフォーマットが少なくとも3.5 logサンプル濃度にわたって機能可能で、良好な直線応答を与えることを証明した。

例5：g a g 3

上述のアッセイ系を改良するために、本発明者らはさらにプローブおよびビーズを用いて、従来ない範囲でのアッセイを提供した。

プローブ溶液2：50回のg a g 3アッセイ用に
 $50\mu\text{l}$ のAKZ02 (ECLオリゴ、 $20\mu\text{g/ml}$)
 $50\mu\text{l}$ のAKZ01 (ビオチン標識オリゴヌクレオチド、 $20\mu\text{g/ml}$)
 を配合した。

サンプルは2つの方法のいずれかによって調製した。

A) 増幅からのサンプル $4\mu\text{l}$ に0.1% SDS, 20mM EDTAを含有する

AKZO緩衝液 $16\mu\text{l}$ を加え、95°Cに5分間加熱する。

B) サンプル $20\mu\text{l}$ に1.25% SDS, 240 mM EDTA $1.8\mu\text{l}$ を加え、95°Cに5分間加熱する。

初期アッセイプロトコール：アッセイチューブ中で以下の順序に混合する。

5 μ lのプローブ溶液 2

5 μ lのサンプル。

50°Cで30分間インキュベートし、ついで10 μ l (40 μ g) のビーズを加えて60分間振盪した。これらのサンプルを485 μ lのECLアッセイ緩衝液によって希釈し、ECLアナライザーでアッセイを行った。試験を行ったサンプルはgag3 'G6', 10⁶コピーのHIV1; 'G5', 10⁵コピーのHIV1; 'G4', 10⁴コピーのHIV1; 'G3', 10³コピーのHIV1; 'G2', 10²コピーのHIV1; 'G1', 10¹コピーのHIV1; および'NT1', 'NT2', 'NT3'のバックグラウンドのための鋳型を含まない対照とした。これらのコピー数のサンプルは例4のようにして増幅し、増幅された配列の存在について1 μ lを分析した。また、増幅サンプルを含まないアッセイにおける非特異的結合の対照として'BB'サンプルを加えた。

結果は以下の通りであった。

サンプル	ECLシグナル
G6	55870
	56541
G5	57798
	58354
G4	66316
	59120
G3	74763
	71190
G2	75315
	69284
G1	301
	296
NT1	276
	285
NT2	283
	295
NT3	312
	283
BB	272
	289

例 6 : 患者の相関試験

患者血液のサンプルを分画化し抽出して、増幅用のRNAを得た。例4と同様にした。これにより、全血(V)、血小板(T)、マクロファージ(M)および血漿(P)からのサンプルが得られた。これらのサンプルを増幅し、これらのサンプルからの増幅のレベルおよび性質を決定するための特異的プローブを用いてサザンプロット分析に付した。この増幅分析からのサンプルについて、ECL系による分析に付した。さらに、インビトロで発生させた標準サンプル、C2, 10^2 ; C3, 10^3 ; C4, 10^4 を陽性対照として用いた。

プローブ溶液2: 50回のgag3アッセイ用に
 $50\mu\text{l}$ のAKZ02 (ECLオリゴ, $20\mu\text{g/ml}$)
 $50\mu\text{l}$ のAKZ01 (ビオチン標識オリゴヌクレオチド, $20\mu\text{g/ml}$)
 を配合した。

$1\mu\text{l}$ のサンプルを $5\mu\text{l}$ に希釈して0.1% SDS, 20mM EDTAとし, 95℃に5分間加熱した。ついで $5\mu\text{l}$ のプローブ溶液を加えた。50℃で30分間インキュベートし、ついで $10\mu\text{l}$ ($40\mu\text{g}$) のビーズを加えて60分間振盪した。これらのサンプルを $485\mu\text{l}$ のECLアッセイ緩衝液で希釈し、ECLアナライザでアッセイした。

ECLカウント

患者番号	T	M	P	V
203	100124	316769	154032	581
204	499	227775	52619	310007
205	581	98188	501	75430
206	510	368765	101581	524
207	7990	251266	115186	81173
208	533	254802	81832	288289
C2	66644			
C3	138150			
C4	146093			
C5	125322			
NT2	207099			
NT3	581			
BB	605			
	605			

さらに患者サンプルを分析した。

E C L カウント

患者番号	T	M	P	V
209	648	777	813	670
210	672	261234	142876	162615
211	237886	242394	187486	228249
212	676	796	697	2802
213	699	8004	152223	143648
228	592	173790	609	539
C2	169992			
C3	128430			
C4	157989			
C5	142345			
NT	575			
NT2	209712			

すべてのデータが、夾雑による問題を示す錫型なしの場合の問題を含め、増幅サンプルで実施したノーザンプロットハイブリダイゼーション試験と相関した。このアッセイにおいて、 $1 \mu\text{l}$ サンプルよりも希釈後に高い結果を与えたサンプル204Pにおいてフック効果の証拠が認められた。このサンプルは、本アッセイの直線応答の限界である 10^{12} より高い値を有したものと考えられる。

このデータは、gag3アッセイおよびpol2アッセイに分けて血漿単離サンプルについてのアッセイで追跡した。また、サンプルを、指示したように全血(V)およびマクロファージ(M)から調製した。

GAG3アッセイ ELC ピークシグナル

アッセイに用いたサンプル容量 n1

サンプル	20	1,000
114	869	602
115	747	674
116	756	646
117	792	770
118	735	709
201V	878	9651
201	943	11149
202V	756	1592
202	722	671
203	21370	196556
204	11450	229730
205	686	686
206	11930	269703
207	13996	151126
208	13217	259667
209	663	585
210	663	608
211	30663	174421
212	684	690
213	21257	227918
228	703	568
NT	869	627
C2	3383	181566
C3	37989	103653
C4	31531	106488
37V	1156	20282
37M	1602	53922

アッセイに用いたサンプル容量 n1

サンプル	20	1,000
41V	8716	262440
41M	3579	192855
42V	747	863
42M	739	806

POL 2 アッセイ ELC ピークシグナル

アッセイに用いたサンプル容量 n1

サンプル	20	1,000
203	183	191
204	24301	> 300000
205	236	284
206	217	278
207	190	558
208	16232	> 300000
209	15150	> 300000
210	204	516
211	3493	254728
212	192	335
213	358	7773
228	200	404
NT	221	398
C2	202	404
C3	11893	> 300000
C4	17613	> 300000

この患者データは、前のノーザンプロット分析と相關した [Van Gemenら, 45 J.Vir.Methods(1993)] .

例 7

上記アッセイフォーマットに加えて、本発明者らはすべての成分が添加されハ

ハイブリダイズされた一連のサンプル、すなわちサンプルおよびビーズを前と同様に50°Cでインキュベートし、この混合物から5~30分でサンプルを採取した実験を行った。シグナルは5分の時点で最大に達し、このアッセイ系のハイブリダイゼーション速度および融通性が指示された。サンプルは 10^2 および 10^3 導入鋳型分子からの2つの対照増幅サンプルの混合物で、これらのサンプルは前の試験で陽性とされたものであった。NTは陰性であったサンプルである。

サンプル	時間(分)	ECLシグナル
C2/C3混合物	5.40	39200
	16.15	49025
	29.25	42960
NT	7.40	863
	22.15	1008
	>30	853

【図1】

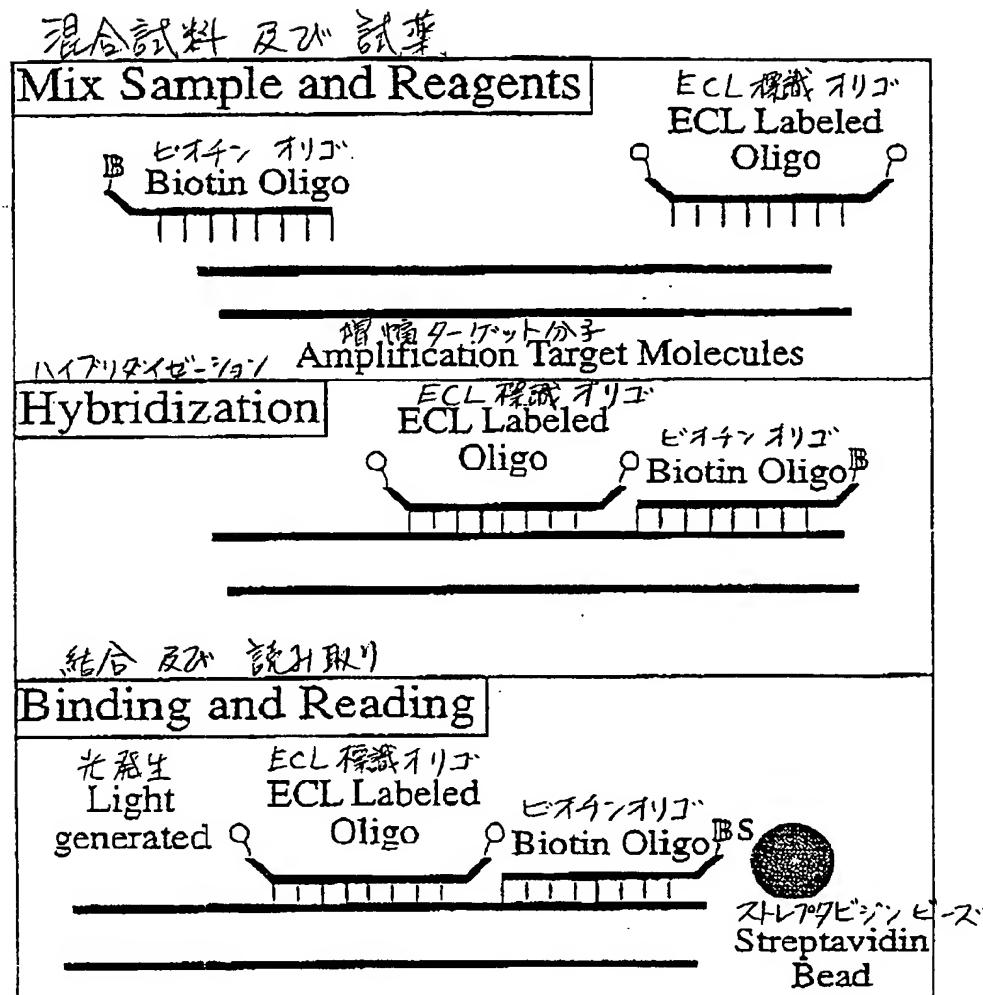


Figure 1

【図2】

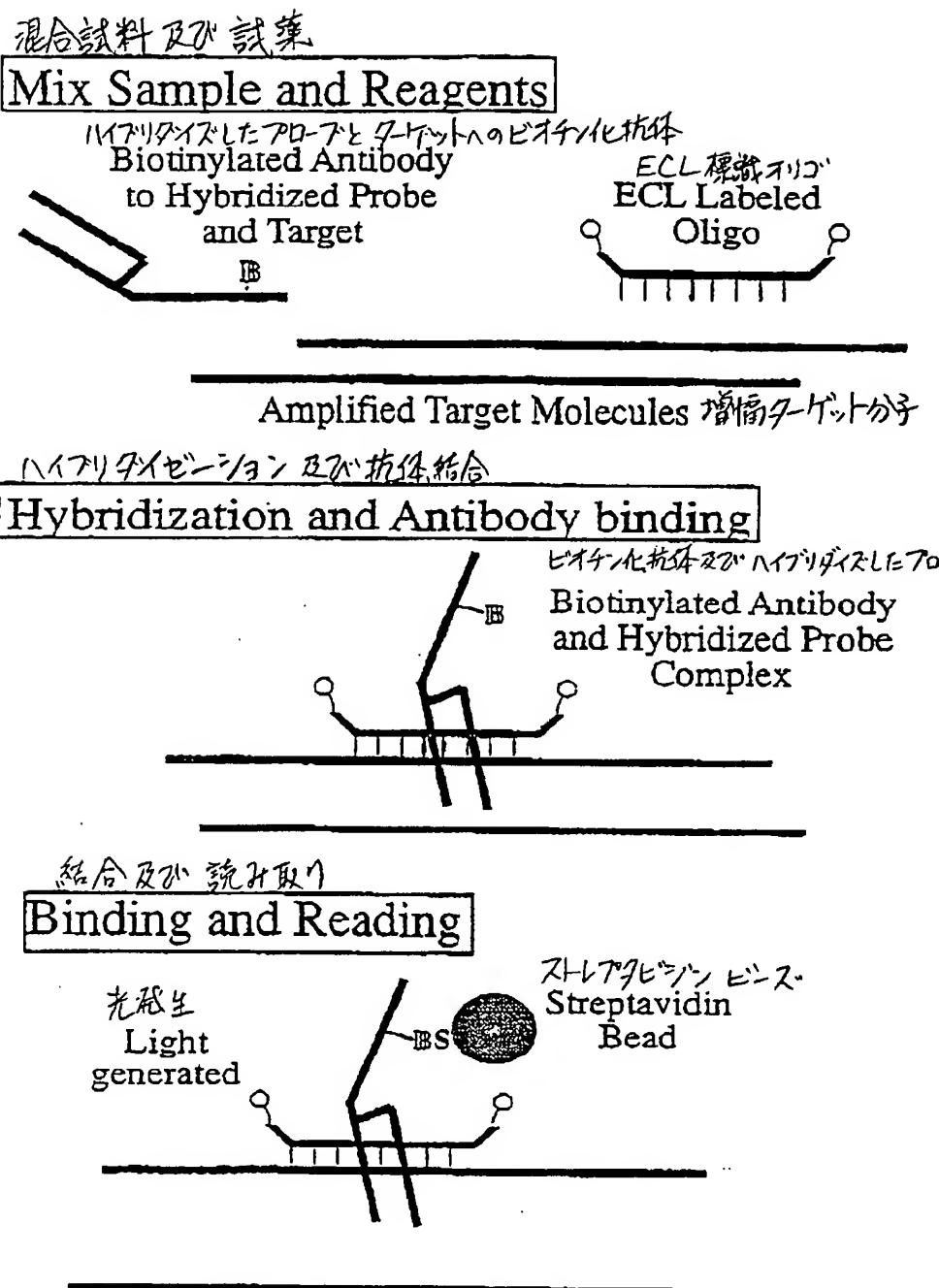


Figure 2

【図3】

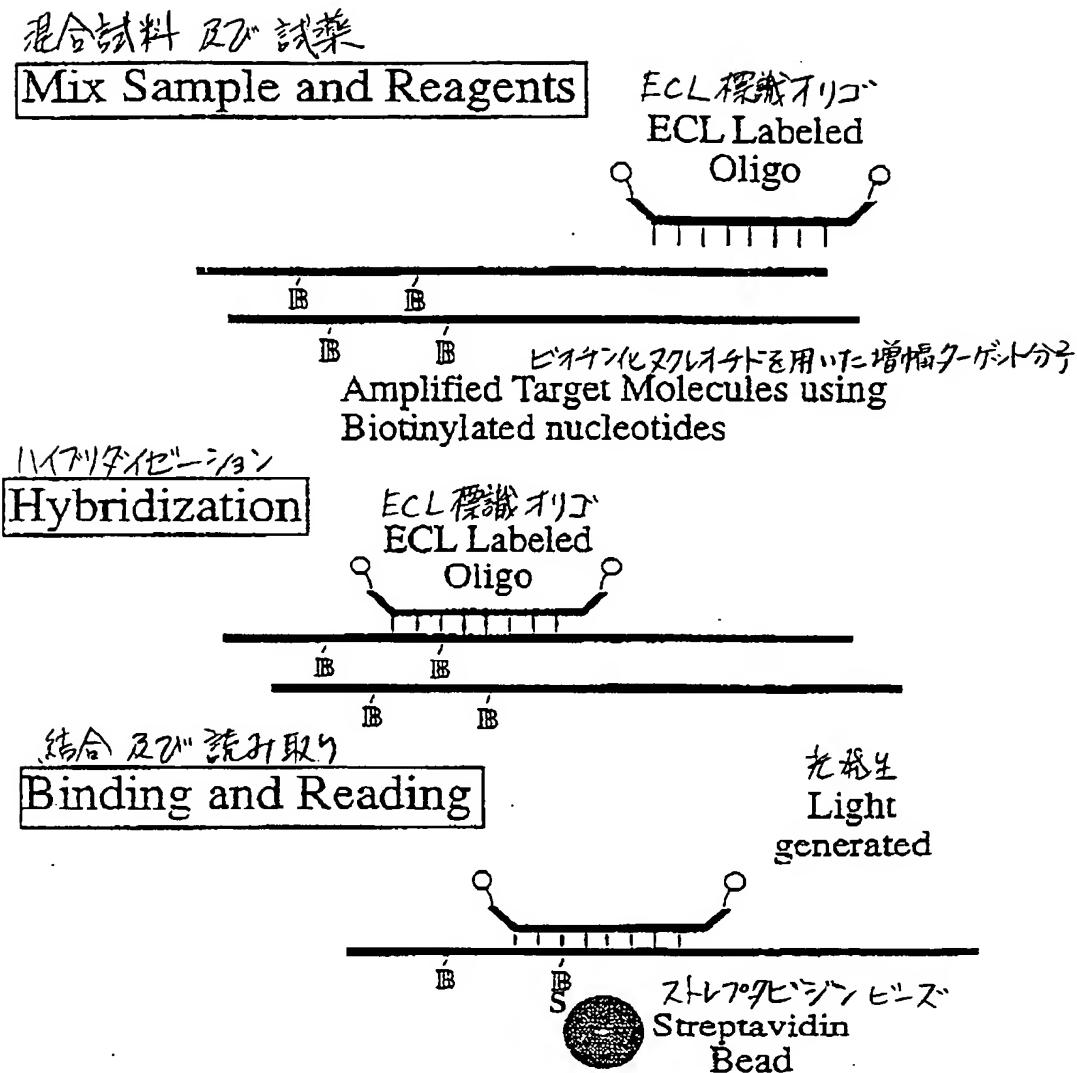


Figure 3

【図4】

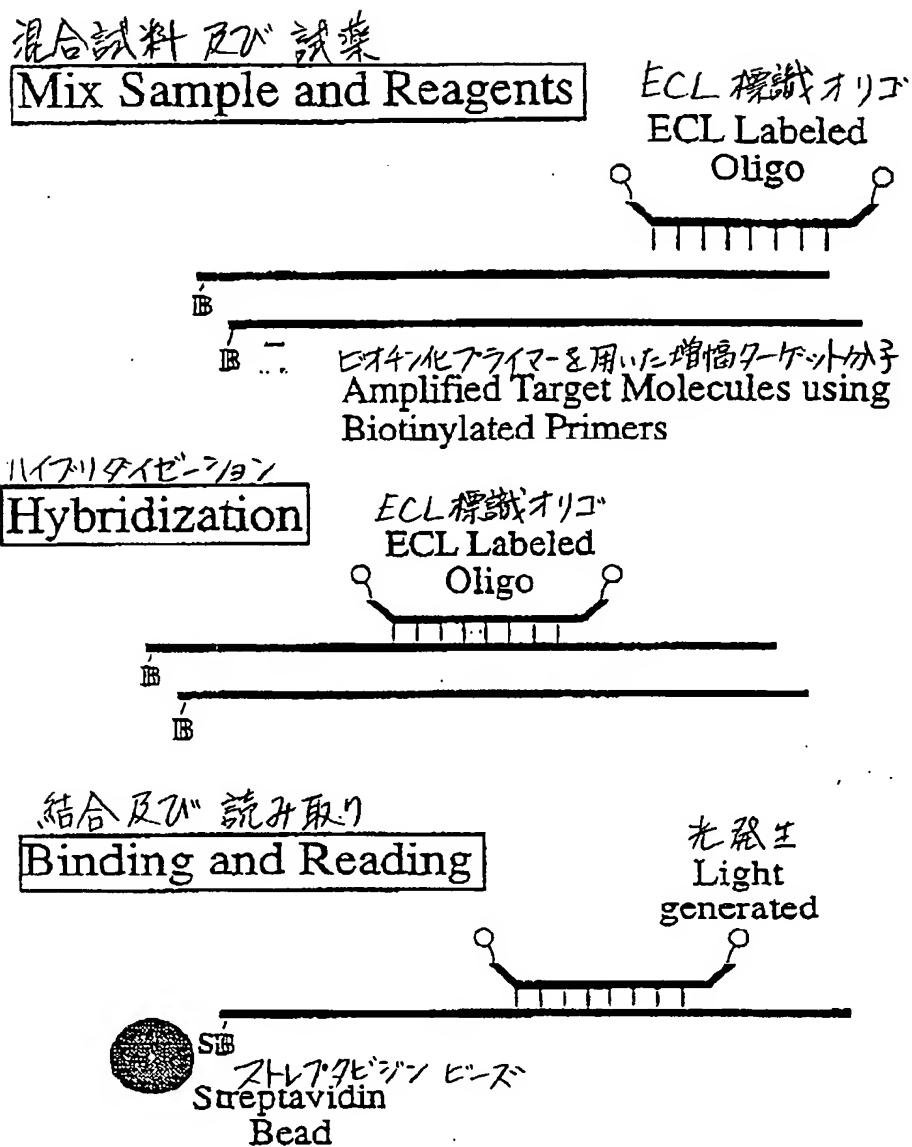


Figure 4

【図5】

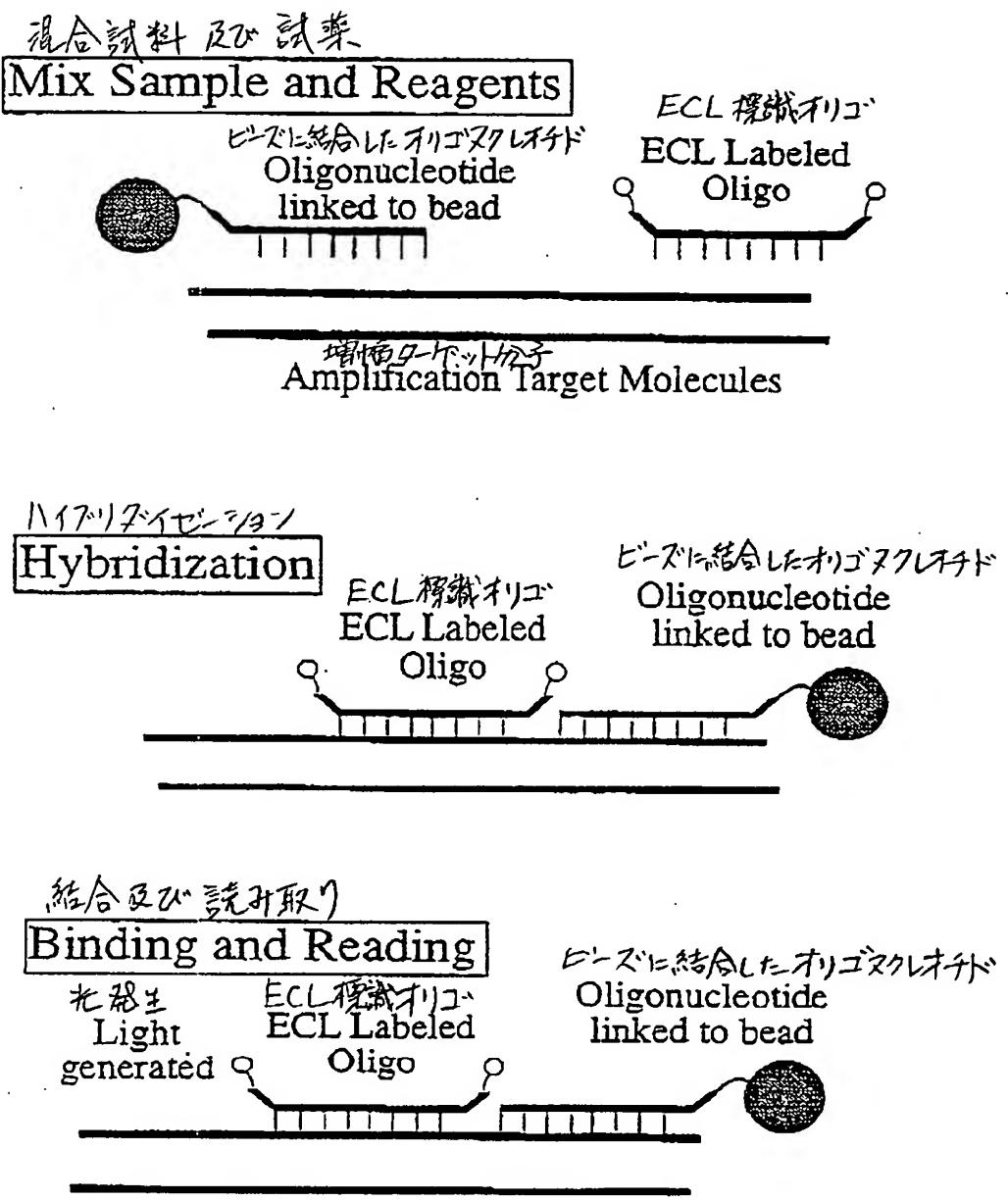


Figure 5

【図6】

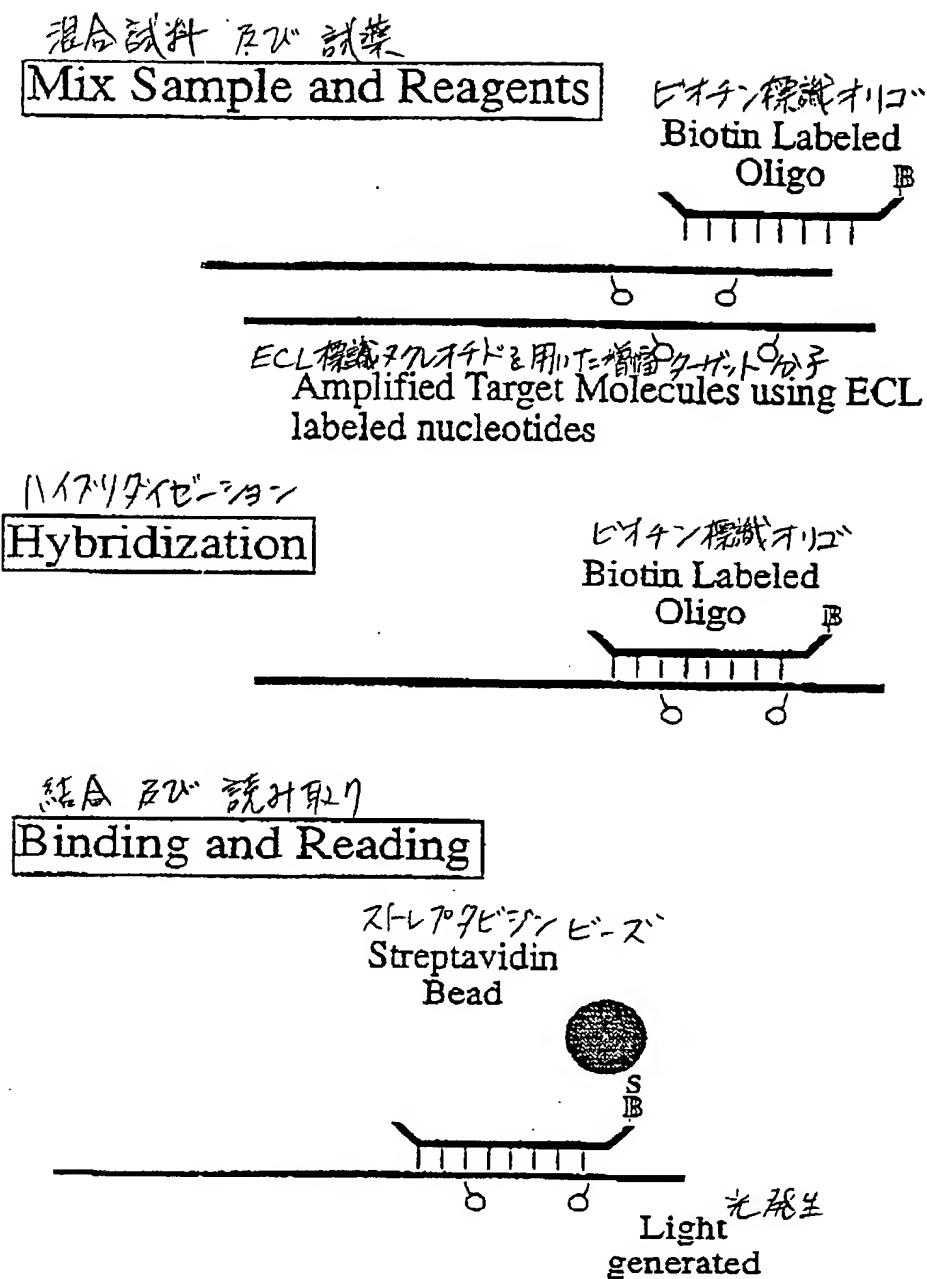
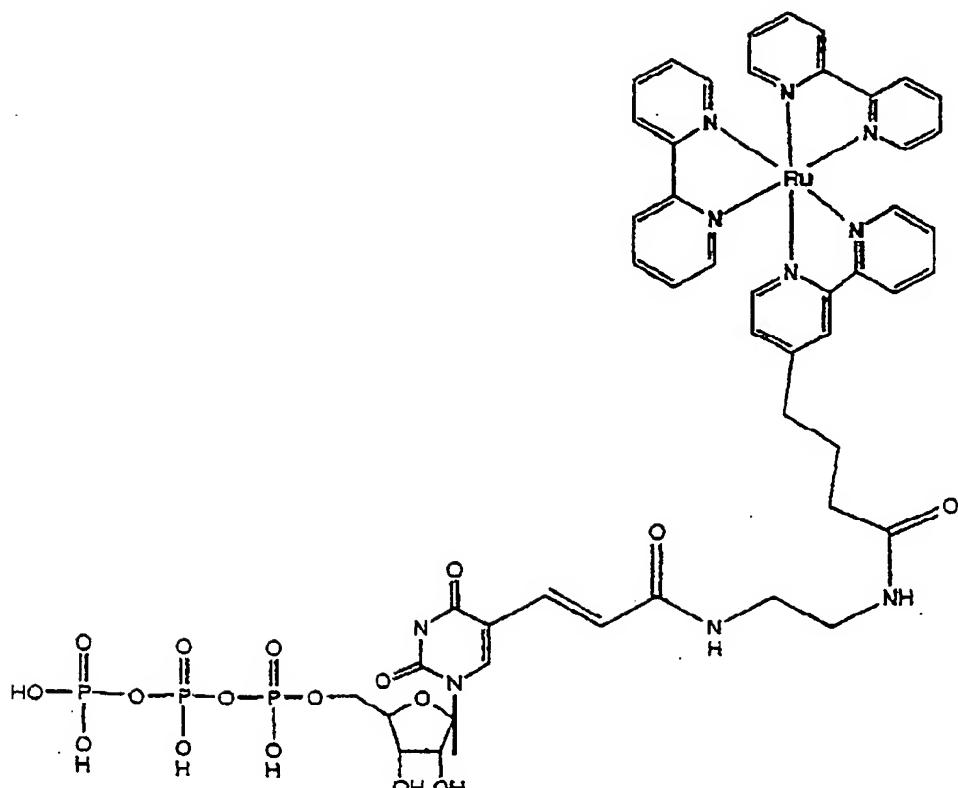


Figure 6

【図7】



ポリメラーゼ取り込み用 ECL標識ヌクレオチド
ECL labeled nucleotide for polymerase incorporation

Figure 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In international application No. PCT/US94/10732
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) :C12Q 1/68; C12P 19/34 US CL :435/6, 91.2, 91.21, 91.51 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.2, 91.21, 91.51		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nucleic Acids Research, Volume 17, No. 22, issued 1989, M. Becker-André et al, "Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)", pages 9437-9446, especially Fig. 1 and page 9443.	18-20
Y	PCR Methods and Applications, Volume 1, issued 1991, E. Fahy et al, "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR", pages 25-33, especially Fig. 1 and pages 25, 28, and 30.	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'B' earlier documents published on or after the international filing date 'L' documents which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) 'O' documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other events 'P' documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
06 DECEMBER 1994	09 JAN 1995	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer DAVID SCHREIBER <i>R. Weisz Jr.</i> Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US94/10732
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 87, issued March 1990, J. C. Guatelli et al, "Isothermal, <i>in vitro</i> amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication", pages 1874-1878, especially page 1874.	1-20
Y	Clinical Chemistry, Volume 37, No. 9, issued 1991, G. F. Blackburn et al, "Electrochemiluminescence Detection for Development of Immunoassays and DNA Probe Assays for Clinical Diagnostics", pages 1534-1539, especially page 1536.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte onal application No. PCT/US94/10732
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):</p> <p>APS, BIOSIS, EMBASE, LIFE SCIENCES COLLECTION, MEDLINE, CA, WPI, DISSERTATION ABSTRACTS search terms: esl, electrochemiluminescence, amplify, isothermal, trimolecular, biotin, DNA directed RNA polymerase, RNA directed DNA polymerase, oligonucleotide, reverse transcriptase, polymerase alpha, polymerase beta</p>		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.°	識別記号	序内整理番号	F I	
// C 12 N 15/09		9162-4B	C 12 N 15/00	A
(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G , C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (K E, M W, S D, S Z), A M, A T, A U, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E , H U, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L K, L R, L T, L U, L V, M D, M G, M N, M W, N L, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E , S I, S K, T J, T T, U A, U S, U Z, V N				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.